Technique de fluoromarquage en masse à grande échelle des otolithes d'alevins vésiculés de truite commune (*Salmo trutta*) à l'aide de l'alizarine red S

par

Arnaud CAUDRON (1) & Alexis CHAMPIGNEULLE (2)

RÉSUMÉ. - L'article décrit la pratique à grande échelle du fluoromarquage en masse des otolithes d'alevins vésiculés de truite commune (*Salmo trutta* L.) par un bain de 3 h dans une solution à 100 mg/L d'alizarine red S. La méthodologie de traitement des otolithes (sagittae) en laboratoire pour détecter les poissons marqués est précisée. Les suivis de lots témoins montrent un marquage pour 100% des individus traités avec une pérennité minimale de la marque de 5 ans. Les résultats d'un test de double marquage réalisé en début et fin de la période de résorption vitelline montrent la possibilité de distinguer au moins deux lots au stade précoce d'alevin vésiculé. L'expérimentation réalisée en grandeur réelle démontre la faisabilité technique de l'utilisation de cette technique de marquage pour évaluer à grande échelle des pratiques de repeuplement qui sont l'objet d'un vif débat international. Les avantages et inconvénients de la technique de marquage sont discutés dans cette perspective.

ABSTRACT. - Large-scale otolith fluoromarking of sac fry of brown trout (*Salmo trutta*) with alizarin red S.

The paper describes the practice at a large scale of otolith fluoromarking in yolk sac fry brown trout (*Salmo trutta* L.) by a 3-hour bath in an alizarin red S solution of 100 mg/L. The methodology of otolith (sagittae) treatment to detect marked fish is detailed and validated. Control batch analysis demonstrated the marking of 100% of fish treated. The results of a double marking at the beginning and at the end of yolk sac resorption demonstrated the possibility to distinguish two batches at the precocious yolk sac stage. This experiment demonstrated the possibility to evaluate at a large scale stocking practices, which are the object of an important international debate. Advantages and disadvantages of the otolith mass marking method are discussed in such a perspective.

Key words. - Salmonidae - *Salmo trutta* - Brown trout - Marking - Otoliths - Alizarin red.

De nombreuses techniques de marquage de poissons existent et sont régulièrement utilisées pour améliorer les connaissances sur la biologie et l'écologie des espèces ou sur la gestion des populations naturelles (Parker *et al*., 1990 ; Nielsen, 1992 ; Champigneulle et Rojas Beltran, 2001). Parmi celles-ci, les techniques de fluoromarquage en masse des otolithes, notamment chez les salmonidés, connaissent une évolution et un développement importants en raison de leur aptitude pour le marquage de grandes quantités d'individus à des stades précoces. Le chlorohydrate de tetracycline (CHTC) a communément été utilisé avec succès comme fluoromarqueur chez plusieurs espèces de poissons (Dabrowski et Tsukamoto, 1986 ; Nagiec *et al*., 1988 ; Ruhlé et Grieder, 1989 ; Alcobendas *et al*., 1991 ; Rojas Beltran *et al*., 1995a, 1995b). Cependant, en raison de son pouvoir antibiotique, son usage a été fortement réglementé dans certains pays ces dernières années (Panfili *et al*., 2002). Ainsi, l'utilisation d'autres fluoromarqueurs, dont la calcéine (Meunier et Boivin, 1978 ; Mohler, 1997, 2003), l'alizarine complexone (Tsukamoto *et al*., 1989a, 1989b ; Beckmann et Schulz, 1996) puis plus récemment l'alizarine red S (ARS) (Blom *et al*., 1994 ; Nagiec *et al*., 1995), moins chère que l'alizarine complexone, s'est développée. Meunier et Boivin (1978) avaient déjà montré que le squelette de poissons vivants pouvait être marqué par une injection intrapéritonéale d'ARS. Mais ce n'est que plus tard que des premières études à petite ou moyenne échelle (Nagiec *et al*., 1995 ; Eckmann *et al*., 1998 ; Caudron et Champigneulle, 2002) ont montré la possibilité d'utiliser le fluoromarquage des otolithes à l'ARS en balnéation pour des suivis de déversements de stades précoces de poissons en milieu naturel.

Le but du présent article a été de : (1) décrire la pratique à grande échelle du fluoromarquage en masse des otolithes d'alevins vésiculés de truite commune (*Salmo trutta* L.) par un bain de 3 h dans une solution à 100 mg/L d'alizarine red S. Ce marquage a concerné pendant trois années consécutives la totalité (3 millions d'alevins par an) des déversements de truite pratiqués dans l'ensemble des rivières de la Haute-Savoie en France ; (2) détailler la méthodologie de traitement des otolithes (sagittae) en laboratoire pour détecter les poissons marqués ; (3) évaluer la qualité et la pérennité du fluoromarquage des otolithes à l'ARS ainsi que la fiabilité de

(1) Fédération de Haute-Savoie pour la pêche et la protection du milieu aquatique, Le Villaret, 2092 route des Diacquenods, 74370 St-Martin-Bellevue, FRANCE. [a.caudron@wanadoo.fr]

(2) INRA - CARRTEL, BP 511, 74203 Thonon CEDEX, FRANCE.

la lecture des marques en microscopie à épifluorescence ; (4) réaliser un essai préliminaire visant à tester chez la truite la faisabilité de créer des marques distinctes par balnéation à l'ARS en début et/ou en fin de la période de résorption vitelline ; (5) discuter, à partir de l'expérience acquise, les avantages et inconvénients de la technique utilisée ainsi que les perspectives qu'elle offre en termes d'évaluation à grande échelle du repeuplement, pratique de gestion faisant l'objet d'un vif débat international.

MÉTHODOLOGIE

Présentation de la technique de marquage

Principe

Le colorant utilisé est l'alizarine red S (ARS) ($C_{14}H_7O_7S$-Na) qui se présente sous la forme d'une poudre rouge ou orangée. L'alizarine red S est un produit certifié par la Biological Stain Commission (USA) pour le marquage vital des petits vertébrés et pour différencier os et cartilage chez les embryons de mammifères. Elle est retenue *in vivo* de façon durable dans les tissus squelettiques.

La méthode de marquage testée à grande échelle a été choisie à la suite de plusieurs essais réalisés à la Station INRA de Thonon (Champigneulle et Rojas Beltran, 2001). Elle consiste en une balnéation de 3 h des alevins vésiculés de truite (*Salmo trutta*) au cours de la période de résorption de la vésicule vitelline, dans une solution à 100 mg/L d'ARS. A ce stade, le colorant se fixe de façon stable (vraisemblablement par chélation avec les ions calcium) au niveau des otolithes qui sont alors les seules parties calcifiées de l'organisme.

Mode opératoire pour la pratique à grande échelle

L'utilisation à grande échelle de la technique a consisté à marquer au stade alevin vésiculé durant 3 années consécutives (2002-2003-2004) la totalité des alevins de truite commune produits sur le département de la Haute-Savoie par les piscicultures associatives. Ainsi, environ 3 millions d'alevins par an ont été marqués par cinq pisciculteurs différents dans six piscicultures utilisant deux pratiques d'incubation, en clayettes ou directement dans des auges d'incubation. Les marquages dans les 6 établissements concernés ont été étalés sur la période février-avril à des températures d'eau allant de 2 à 10°C selon les lots ou les piscicultures.

Une visite préalable de ces piscicultures a permis, pour chacune d'entre elles, de préciser le volume d'eau (selon les cas : 70, 150, 160, 220, 320 et 340 L) des différentes auges utilisées pour le marquage et d'établir les quantités de colorants nécessaires dans chaque cas pour obtenir une solution colorante à 100 mg d'ARS/L. Afin de garantir cette concentration pour toutes les opérations de marquage, des flacons de colorants correspondants à chaque cas ont été préparés en laboratoire et distribués à chaque pisciculteur. Sur chaque site, une formation du pisciculteur au protocole et aux précautions d'emploi a été réalisée en effectuant le premier marquage avec lui. Les pisciculteurs ont ensuite pratiqué seuls les marquages suivants.

Les opérations du marquage se sont enchaînées comme suit :

L'auge d'incubation contenant les alevins à traiter est préparée. Son alimentation en eau est coupée et le système de vidange est totalement étanchéifié. Un système d'oxygénation simple de l'eau est mis en place pour éviter les risques d'asphyxie.

Après l'avoir dilué dans 10 L d'eau, la quantité prédosée d'ARS, correspondant au volume utilisé, est introduite progressivement dans l'auge. Le bain colorant, contenant une concentration finale d'ARS égale à 100 mg/L, est homogénéisé par brassage manuel. Afin d'assurer une répartition optimale du colorant pendant toute la durée de la balnéation, un système de circulation d'eau en circuit fermé à l'aide d'une pompe peut être installé.

Après 3 h de balnéation, la circulation normale de l'eau est progressivement rétablie ce qui permet d'évacuer lentement le colorant et de retrouver progressivement une eau claire.

Dans le cas d'une résorption en clayettes, il est aussi possible de réserver une auge ou un bassin spécifiquement pour le marquage et de simplement déplacer les clayettes contenant les alevins.

Taux de marquage et pérennité des marques

Les objectifs de l'étude ainsi que son échelle de travail ont nécessité de s'assurer de la qualité des marquages réalisés et de la pérennité des marques obtenues. Un protocole de suivi de lots marqués, adapté aux contraintes des différentes piscicultures et aux pratiques de repeuplement, a été mis en place (Tab. I).

Pour trois piscicultures (P1, P2 et P3) pouvant garder des alevins au-delà de la phase de résorption, des prélèvements au hasard d'environ 50 spécimens 0^+ ont été réalisés en automne, directement dans les auges.

Pour les trois autres établissements (P4, P5 et P6) ne pouvant pas garder d'alevins en phase de grossissement et pratiquant des repeuplements précoces, le contrôle du marquage au stade 0^+ a été réalisé sur des lots témoins déversés en milieu naturel. Ainsi, 5 secteurs isolés répartis sur différents ruisseaux ont été sélectionnés selon les deux critères suivants : (1) absence totale de recrutement naturel et (2) impossibilité d'être naturellement colonisés via l'amont ou l'aval par une population déjà présente dans le milieu. Cinq lots témoins d'alevins marqués ont été introduits au printemps sur ces secteurs qui ont ensuite été échantillonnés (17 à 100 individus 0^+ prélevés selon les secteurs) par pêche électrique à l'automne.

Un échantillonnage complémentaire d'environ 50 spécimens 1^+ par lot a été pratiqué sur deux lots témoins gardés dans deux piscicultures.

Enfin, pour s'assurer de la pérennité à long terme de la marque, des individus plus âgés (3^+ et 4^+) ont été prélevés dans une des piscicultures gardant depuis plusieurs années un lot témoin de truites marquées selon la même technique.

Pour préciser la fiabilité de l'étape de lecture, tous les lots témoins échantillonnés dans les différentes piscicultures et aux différents stades, ont été lus par deux observateurs différents. Chaque observateur a classé les otolithes observés en 3 catégories possibles : otolithe non marqué, otolithe marqué et otolithe aberrant illisible.

En outre, un test de double lecture a également été réalisé sur 11 lots provenant de prélèvements de 0^+ en milieu naturel sur des sites repeuplés 6 mois auparavant avec des alevins marqués (Tab. I). Les truitelles échantillonnées ont été conservées au congélateur à -18°C. Leur âge a été déterminé par scalimétrie. Les lots de juvéniles 0^+ étaient susceptibles de contenir dans des proportions inconnues pour les deux observateurs des individus marqués et non marqués. Pour chacun des lots, les classements vis-à-vis du marquage réalisés par les deux observateurs ont été confrontés pour chaque truitelle 0^+.

Tableau I. - Caractéristiques des différents lots de poissons étudiés pour la validation du marquage à grande échelle d'otolithe de truite à l'alizarine RedS et pour les essais préliminaires de double marquage. *[Characteristics of different trout batches studied for the large scale validation of otolith marking with Alizarine red S and for preliminary trials of double marking.]*

Origine du lot	Lot	Pisciculture	Classe d'âge	Effectif
Lots témoins gardés en pisciculture	T1	P1	0+	51
	T2	P2	0+	49
	T3	P3	0+	51
	T4	P1	1+	48
	T5	P3	1+	49
	T6	P1	3+/4+	43
Lots témoins gardés en milieu naturel	T7	P4	0+	49
	T8	P4	0+	42
	T9	P5	0+	100
	T10	P5	0+	23
	T11	P6	0+	17
Total lots témoins				522
Lots échantillonnés en automne sur des rivières repeuplées 6 mois auparavant avec des alevins marqués	M1	P1	0+	77
	M2	P1	0+	54
	M3	P2	0+	15
	M4	P3	0+	58
	M5	P3	0+	69
	M6	P4	0+	70
	M7	P4	0+	35
	M8	P5	0+	44
	M9	P5	0+	63
	M10	P6	0+	84
	M11	P6	0+	56
Total lots rivière				625
Lots pour marquage différenciel en début et/ou fin de résorption	A	P2	0+	43
	B	P2	0+	35
	C	P2	0+	29

Essai de multimarquage

En complément du marquage à grande échelle, des essais de marquage à deux périodes différentes au cours de la phase de résorption de la vésicule vitelline ainsi qu'un double marquage ont été réalisés afin de tester la possibilité de distinguer plusieurs lots.

Ainsi, 3 lots expérimentaux ont été constitués (Tab. I) :

Lot A : 1 seul marquage réalisé en début de période de résorption à 10°C-jour après éclosion des œufs.

Lot B : 1 seul marquage réalisé en fin de période de résorption à 220°C-jour après éclosion des œufs.

Lot C : 2 marquages réalisés l'un en début et l'autre en fin de période de résorption respectivement à 10°C-jour et 220°C-jour après éclosion des œufs.

Après marquage, l'élevage des lots a été poursuivi jusqu'au stade jeune truitelle (4-5 cm) et des échantillons ont été examinés par deux observateurs selon la procédure décrite ci-dessus.

Extraction des otolithes (sagittae) et recherche du fluoromarquage

Les principales phases de l'extraction et de la recherche de marque sur les otolithes (2 sagittae) sont précisées ci-dessous.

Découpe et enlèvement, avec des ciseaux, de la moitié inférieure de la tête partiellement décongelée.

Découpage en deux (plan sagittal) de la moitié supérieure de la tête. Dans le cas de petites truites, on peut faciliter la symétrie de cette découpe en faisant entrer la pointe inférieure d'un ciseau dans le canal rachidien. Ce mode de découpe sépare et sectionne les capsules contenant les sagittae qui, une fois le cerveau enlevé, sont alors directement accessibles avec des pinces fines dans chaque demi-section de la partie supérieure de la tête.

Extraction des sagittae à l'aide de pinces fines. Après avoir enlevé les matières organiques résiduelles sur un papier absorbant les otolithes sont placés à sec dans un tube eppendorf de 1,5 ml.

Collage de chaque otolithe (côté gouttière "sulcus acusticus" contre la lame) sur une lame de verre mince à l'aide d'une thermocolle (colle Crystalbonb Aremco n° 509) liquéfiée dans une coupelle en pyrex placée sur une plaque chauffante réglée à 220-230°C.

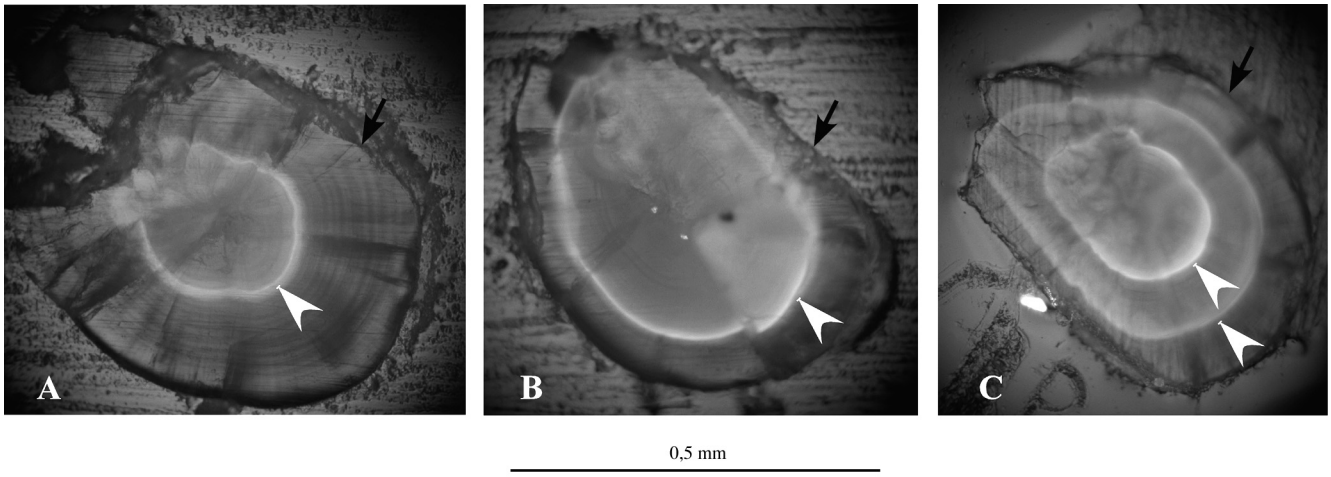

Figure 1. - Photographies, en microscopie à épifluorescence, des anneaux de marquage obtenus sur des otolithes (sagittae) de truite commune par une balnéation de 3 h dans une solution d'Alizarine red S à 100 mg/L. Flèches blanches : localisation des anneaux de marquage. Flèches noires : contour de l'otolithe. **A** : Marque obtenue par balnéation en début de période de résorption vitelline. **B** : Marque obtenue par balnéation en fin de période de résorption vitelline. **C** : Double marquage obtenu par balnéation en début et en fin de période de résorption. *[Pictures in epifluorescence microscopy of marking rings obtained in otoliths (sagittae) of brown trout immersed during 3 h in a 100 mg/L solution of Alizarine red S. White arrows: marking rings. Black arrows: the otolith outline.* ***A****: Mark produced by an immersion at the beginning of yolk sac resorption.* ***B****: Mark produced by an immersion at the end of yolk sac resorption.* ***C****: Otolith with two marks produced by two immersions at the beginning and at the end of yolk sac resorption.]*

Durant, cette étape, il est recommandé de limiter les bulles d'air existantes, celles-ci pouvant émettre une fluororescence parasite.

Polissage des otolithes sur des papiers abrasifs de granulométrie différente (Escil PSA G 400, G 800 et G 1200). Le polissage est suivi par plusieurs contrôles sous microscope, en lumière naturelle afin d'atteindre et de ne pas dépasser le centre de l'otolithe.

Identification de la présence éventuelle d'une marque par lecture de l'otolithe en microscopie à épifluorescence. Lorsque l'otolithe a été marqué, celui-ci montre en son centre un disque ou un anneau (selon la précocité du marquage et/ou le positionnement du plan de polissage par rapport au nucléus) apparaissant rouge fluorescent (jeu de filtres Zeiss n°15 : BP 546/12, FT 580, LP 590). Les marques obtenues en utilisant de fortes concentrations d'ARS peuvent parfois être détectables en lumière naturelle. Cependant, avec le type de marquage pratiqué dans la présente étude, il est préconisé d'utiliser systématiquement la microscopie à épifluorescence.

RÉSULTATS

Fiabilité de la technique de marquage

Les observations faites dans toutes les piscicultures concernées par le marquage ont montré que la mortalité post-marquage est restée inférieure à 5‰ et non différente de la mortalité observée sur des lots comparables non marqués. Les trois années de pratique dans 6 piscicultures différentes et sur plusieurs millions d'alevins sans observer de surmortalité en pisciculture montrent que cette méthode de marquage à l'ARS ne provoque pas, ou très peu, de mortalité post-marquage chez les alevins vésiculés de truite.

Les résultats de double lecture obtenus sur les 11 lots témoins gardés en pisciculture ou en milieu naturel sont entièrement concordants, quelle que soit la classe d'âge, entre les deux observateurs. De même, aucun désaccord de lecture entre les deux observateurs n'a été relevé sur les 11 échantillons de juvéniles 0^+ prélevés au hasard sur des rivières repeuplées.

Ces observations confirment la bonne qualité et la lisibilité des marques à l'ARS (Fig. 1) selon la technique décrite et garantissent ainsi la fiabilité de celle-ci.

Pour les 522 poissons des 11 lots témoins, 512 soit 98% présentaient au moins un otolithe normalement calcifié dans sa partie centrale permettant de déterminer la présence ou l'absence d'un marquage à l'ARS. Selon les deux observateurs, la totalité de ces poissons marqués au stade alevin vésiculé, quelle que soit l'origine du lot et la classe d'âge, a montré une marque bien visible sans possibilité d'erreur au filtre ARS.

Dans le cas de deux lots échantillonnés dans la même pisciculture au stade 0^+ (cohorte 2003) et 1^+ (cohorte 2002), respectivement 4% et 16% d'otolithes aberrants se sont révélés illisibles. Ces derniers semblent présenter une structure anormalement cristallisée et ne permettent pas de retrouver une marque laissée par l'ARS. Sur ces mêmes lots, les individus présentant un otolithe non aberrant avaient tous une marque de très bonne qualité.

La marque est pérenne puisque 100% des individus marqués au stade alevin vésiculé montrent encore une marque nettement lisible aux stades 3^+ et 4^+.

L'ensemble de ces résultats indique que cette technique de marquage en masse est performante et particulièrement adaptée aux suivis spatio-temporels du repeuplement. Elle permet de marquer 100% des individus de façon pérenne avec une qualité de marque permettant son identification sans ambiguïté.

Essai de multimarquage

Quelle que soit l'époque du marquage, en début ou fin de résorption de la vésicule vitelline, le taux d'individus marqués est de 100%.

Dans le cas du lot C qui a subi deux marquages, les doubles marques sur les otolithes sont nettement visibles (Fig. 1). Elles ont été repérées sans ambiguïté (présence de deux anneaux distincts) par les deux observateurs sur tous les individus. Les marques laissées par l'ARS apparaissent suffisamment fines et séparées pour discriminer les deux anneaux. Ainsi, les individus de ce lot sont très nettement distinguables de ceux des autres lots, A et B, qui ont subi un seul marquage. En revanche, la distinction entre ces deux derniers, n'apparaît pas immédiate par simple observation microscopique directe. Au moment des opérations de marquage, la taille des otolithes des individus du lot A et celle des individus du lot B est sensiblement différente puisque les deux balnéations ont été réalisées à 210°C-jours d'intervalle. Cette différence se traduit, en microscopie à épifluorescence, par une marque en anneau plus ou moins éloignée du nucleus selon la période du marquage. Cependant, cette différence de taille des anneaux de marquage entre les lots A et B n'est pas suffisamment directement perceptible sous microscope pour permettre de les distinguer sans effectuer des mesures supplémentaires.

DISCUSSION

A partir de l'expérience acquise dans la présente étude, il apparaît utile de discuter des possibilités et des limites de la technique de marquage par balnéation à l'ARS en la confrontant à la littérature, en particulier dans le domaine du marquage en masse à des stades précoces et pour une utilisation à grande échelle.

Faisabilité et fiabilité de la technique de marquage en masse à grande échelle

Les résultats obtenus dans la présente étude ont montré que la technique de marquage des otolithes à l'ARS utilisée à grande échelle est effective à 100% pour la totalité des alevins vésiculés de truite avec une pérennité minimale de 4-5 ans (100 % de marqués). Par ailleurs, l'étude montre qu'aucune erreur n'a été constatée lors de la phase de lecture de l'otolithe en microscopie à épifluorescence. Plusieurs études réalisées sur d'autres espèces font également état d'une bonne pérennité du marquage à l'alizarine. Nagiec *et al*. (1995) observent une pérennité du marquage allant jusqu'à 718 jours pour des ombres communs (*Thymallus thymallus*) marqués au stade de larves de 14-15 mm dans un bain de 3-4 h dans une solution de 70 mg d'ARS/L. Champigneulle et Cachera (données non publiées), pour un lot de corégones (*Coregonus lavaretus*) marqué à un stade très précoce (juste avant l'éclosion) par un bain de 3 h dans une solution d'ARS à 200 mg/L ont obtenu un taux final d'individus marqués à 3 ans de 100%. De même, Eckmann *et al*. (1998) signalent une bonne qualité et une bonne pérennité (jusqu'à 620 jours) du marquage de larves de corégone (*Coregonus albula*) en balnéation de 3 h dans une solution à 100 mg ARS/L.

La méthode de marquage en masse d'alevins vésiculés de truite commune à l'alizarine red S décrite ici apparaît performante et fiable et semble particulièrement bien adaptée aux objectifs d'études à grande échelle visant à suivre des d'individus introduits en masse en milieu naturel.

Tout d'abord le fait que le mode opératoire proposé se révèle facile d'emploi et surtout aisément transmissible après une formation simple, permet d'entreprendre des marquages par différents opérateurs dans différentes structures sans mettre en doute la réussite de chaque opération. La concentration de 100 mg/L et la durée de balnéation de 3 h sont un bon compromis. La concentration utilisée est suffisamment forte pour permettre un marquage en 3 h tout en évitant des mortalités au marquage notées par certains auteurs à des concentrations d'ARS plus élevées (Blom *et al*., 1994 ; Beckman et Schulz, 1996 ; Eckmann *et al*., 1998). Blom *et al*. (1994) ont marqué avec succès (100% de marqués et faible mortalité) des larves de morue (*Gadus morhua*) par une balnéation de 24 h dans une solution d'ARS à 100 mg/L, mais des concentrations supérieures (200 et 400 mg/L) avec la même durée ont provoqué d'importantes mortalités. Beckman et Schulz (1996) obtiennent un marquage fiable (100% de marqués, mortalité faible, persistance minimale de 160 jours) sur des larves de meunier noir (*Catostomus commersoni*) par une balnéation de 12 ou 24 h dans une solution d'ARS de 200-300 mg/L, mais une mortalité significative a été observée à partir de 400 mg/L. Pour des larves de corégone (*Coregonus albula*), Eckmann *et al*. (1998) ont obtenu des mortalités faibles à 100 mg ARS/l pendant 3 h et des mortalités plus fortes (10-100%) à 150-300 mg ARS/L.

La concentration de 100 mg/L reste suffisamment faible pour ne pas nécessiter un ajustement du pH. La durée de 3 h de balnéation est compatible avec l'organisation du travail en pisciculture et permet de mener et de surveiller 2 à 3 séries de marquages par jour.

Les techniques alternatives de balnéation avec choc

osmotique (CHTC : Alcobendas *et al*., 1991 ; calcéine : Mohler, 2003) ont l'avantage d'être très courtes mais elles nécessitent une plus étroite surveillance du comportement des alevins vésiculés. La balnéation à la tétracycline avec choc osmotique a cependant été utilisée avec succès dans plusieurs suivis écologiques de populations d'anguille (Alcobendas *et al*., 1991 ; Meunier, 1994) ou d'évaluation de repeuplements en truite (Caudron et Champigneulle, 2002 ; Champigneulle *et al*., 2002). Cette dernière technique, bien que permettant un marquage à 100% et durable, a cependant l'inconvénient de provoquer sur des alevins vésiculés de truite des mortalités postmarquage pouvant atteindre 10 à 15% (Champigneulle, données non publiées). Ces taux de mortalité sont difficilement acceptables dans le cas d'opérations de marquage de plusieurs millions d'individus car ils peuvent se traduire par la mort de plusieurs centaines de milliers de poissons. De plus, l'usage de ce colorant antibiotique pouvant générer de fortes résistances bactériennes, a été fortement réglementé ces dernières années (Panfili *et al*., 2002).

L'alizarine complexone a déjà été employée avec succès à grande échelle (Tsukamoto *et al*., 1989a, 1989b) chez plusieurs espèces. L'intérêt de l'utilisation de l'ARS est de fournir des résultats comparables à ceux qui sont obtenus avec l'alizarine complexone mais avec un coût significativement moindre (Blom *et al*., 1994 ; Beckman et Schulz, 1996) ce qui est important pour ces opérations de marquage de grande envergure, comme c'est le cas de la présente étude.

Possibilités de multimarquage

L'étude a montré la possibilité de distinguer très nettement deux lots par balnéation simple ou double pendant la période de résorption. Au cours de cette période, deux balnéations pratiquées à un intervalle de 210°C-jour permettent en effet d'obtenir deux anneaux de marquage distincts sans chevauchement. Ce type de marque multiple, déjà obtenu au stade alevin vésiculé chez les salmonidés (Tsukamoto *et al*., 1989a) avec d'autres marqueurs (tétracycline et alizarine complexone), s'avère donc également possible avec l'ARS.

Une observation directe en microscopie à épifluorescence permet de faire aisément la distinction entre les lots simplement marqués et doublement marqués. En revanche, pour différencier les deux lots d'individus marqués en début et en fin de période de résorption, il serait nécessaire d'envisager une étape supplémentaire de prises de micromesures sur écran afin de caractériser la position des marques par rapport au nucleus. A notre connaissance, de tels travaux n'ont pas encore été publiés et des investigations complémentaires seraient donc à entreprendre pour permettre de distinguer sans erreur les lots marqués en début et en fin de résorption.

Dans le cas d'espèces à longue période de résorption (comme les espèces de salmonidés à gros œufs) ces variantes dans les techniques de marquage des otolithes à l'ARS permettraient de différencier dès les stades précoces deux à trois groupes différents. Ceci élargirait encore le champ d'application du fluoromarquage à l'ARS.

Limites

La principale limite des diverses techniques de fluoromarquage des otolithes est la nécessité de devoir sacrifier le poisson pour rechercher la présence éventuelle d'une marque. La méthode est donc mieux adaptée aux études portant sur les pêcheries (poissons pêchés et prélevés par les pêcheurs) que sur la fraction non exploitée des populations. Des études récentes utilisant la calcéine en balnéation suggèrent des résultats prometteurs. En effet, elles présentent l'avantage de permettre la détection du marquage sur des poissons vivants. Ainsi, Mohler (1997), après une balnéation de 48 h d'alevins vésiculés (60 jours après éclosion) de saumon atlantique dans une solution de 150 et 250 mg/L de calcéine, obtient des taux d'individus marqués à 234 jours post-immersion de respectivement 93 et 97%. L'auteur signale que les marques obtenues avec un bain à 250 mg/L sont plus facilement visibles mais le taux de mortalité est cependant plus élevé (18%). Depuis, Mohler (2003) a montré également la possibilité de marquer des alevins vésiculés de saumon atlantique par 2 balnéations successives : une première balnéation de 3 mn 1/2 dans une solution salée à 5% de NaCl suivie d'un rapide bain de rinçage avant de pratiquer une deuxième balnéation de 3 mn 1/2 dans une solution à 1% de calcéine. L'utilisation d'un détecteur de calcéine permettait de repérer de façon non létale la présence d'une marque visible sur les rayons de nageoires 47 jours après le marquage. Cependant, ces techniques de marquage utilisant la calcéine ainsi que les méthodes de lecture non létales sont encore insuffisamment validées pour envisager leur utilisation dans le cadre de suivis à grande échelle et à long terme. Par ailleurs, l'utilisation de la calcéine, marqueur se fixant dans les écailles et rayons de nageoires, reste à être autorisée pour des poissons de consommation (Mohler, 2003).

Le deuxième principal inconvénient de la technique de fluoromarquage des otolithes est que le repérage de la marque n'est pas immédiat et qu'il nécessite un travail relativement important en laboratoire (dissection du poisson et préparation de l'otolithe) ainsi que l'utilisation d'un microscope à épifluorescence.

Enfin, encore peu d'études ont comparé le comportement, la croissance et la survie entre individus marqués et non marqués aux otolithes après leur relâcher en milieu naturel. Un travail de Meunier et Boivin (1978) a montré qu'il était possible de concilier un bon marquage des tissus osseux de la truite avec l'alizarine sans affecter sa croissance. Une étude de Mohler *et al*. (2002) montre que des alevins de saumon atlantique avec les otolithes marqués à la calcéine n'étaient pas soumis davantage à la prédation des ombles de fontaine sauvages comparativement à des alevins non marqués.

Comme dans le cas de tout autre fluoromarqueur des otolithes, par précaution, lors de changement de fournisseur d'ARS ou de lot de fabrication, il est recommandé de réaliser un essai préalable à petite échelle pour vérifier l'innocuité du traitement et la qualité de la marque produite.

Cas des otolithes totalement aberrants

La présente étude a révélé sur des lots témoins issus d'une pisciculture quelques cas d'otolithes anormalement cristallisés pour lesquels il a été impossible d'observer une marque. L'existence de faibles taux d'otolithes anormalement calcifiés (otolithes dits cristallins selon Morales-Nin, 2000) a été décrite dans la littérature chez plusieurs espèces de salmonidés : *Oncorhynchus mykiss* (Mugiya, 1972 ; Campana, 1983), *Oncorhynchus tshawytsha* (Gauldie, 1986). La zone aberrante peut être constituée d'un dépôt de calcite (Strong *et al*., 1986 ; Morales-Nin, 2000) ou de vatérite (Mugiya, 1972 ; Campana, 1983 ; Gauldie, 1986) au lieu d'aragonite. Ces études font principalement mention d'otolithes partiellement aberrants pour lesquels il persiste une zone centrale normale conservant l'aptitude à retenir le marquage pratiqué précocement au stade alevin vésiculé.

En revanche, les otolithes totalement aberrants observés dans la présente étude ont une apparence homogène entièrement translucide. Contrairement aux otolithes normaux ou partiellement cristallins, il a été impossible de mettre en évidence la marque à l'ARS. Ces cas restent cependant extrêmement rares. En effet, Caudron et Champigneulle (données non publiées) ont observé, sur plusieurs milliers de poissons étudiés, un faible taux (0,6%) d'otolithes totalement cristallins. De plus, ce phénomène semble d'autant plus marginal que tous les cas relevés proviennent de la même pisciculture et qu'aucun autre cas n'a été observé sur des lots prélevés en milieu naturel. A ce sujet Campana (1983), trouve plus d'otolithes partiellement aberrants chez des poissons d'élevage que chez les poissons sauvages.

Selon Panfili *et al*. (2002) les otolithes ne semblent pas sujets à des résorptions minérales même si Mugiya et Uchimara (1989) ont observé quelques rares cas de résorption, uniquement périphérique et en cas de stress extrême. Il apparaît plus probable que l'absence de marquage à l'ARS sur ce type d'otolithe soit plutôt dû à un défaut de fixation de l'ARS plutôt qu'à un phénomène de remaniement postmarquage.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le présent travail a permis, sur le plan méthodologique, de tester la mise en œuvre à grande échelle d'une technique qui s'était révélée satisfaisante et fiable à petite échelle. La faisabilité du changement d'échelle a été montrée par le marquage durant trois années de suite de plusieurs millions d'alevins vésiculés (destinés au repeuplement des rivières sur l'ensemble de la Haute-Savoie), avec diverses origines d'œufs et dans plusieurs piscicultures. Ceci montre une certaine robustesse et fiabilité de la méthodologie de marquage de masse employée à grande échelle.

La réussite de ces opérations de marquages et le fait que la totalité des poissons introduits dans le milieu naturel soit marquée permettent de connaître avec certitude, sur un vaste réseau hydrographique, l'origine (repeuplée ou naturelle) des individus présents dans les populations en place ou exploitées. Par ailleurs il devient possible de comparer les caractéristiques et la dynamique spatio-temporelle de ces deux composantes du recrutement dans les populations en place et dans les pêcheries. Les premiers travaux réalisés sur ce sujet (Caudron et Champigneulle, 2002 ; Champigneulle *et al*., 2002 ; Champigneulle et Cachera, 2003) montrent que le travail à plus grande échelle rend plus aisée la recherche des facteurs explicatifs des fortes variations interstations (0 à 100%) observées dans la contribution des poissons alevinés.

La possibilité de marquer à l'ARS différemment plusieurs lots rend possible : les études de comparaison de la contribution spatio-temporelle du repeuplement selon les différents types de pratiques utilisés (souches de poisson, stades et époques de déversement) et selon les caractéristiques des milieux récepteurs ; l'analyse comparative des caractéristiques des poissons issus du recrutement naturel et de ceux qui ont été introduits (taille, croissance, morphologie, coefficient de condition) et le suivi de leur évolution dans le temps ; la méthodologie peut contribuer à des programmes de biologie de la conservation, même en situation de repeuplement. En effet, le marquage de la totalité de la fraction repeuplée permet le repérage de populations naturellement fonctionnelles se traduisant par une faible contribution des individus marqués.

De plus, la pérennité de la marque jusqu'à un âge élevé permet d'envisager le suivi des poissons marqués jusqu'au stade adulte et dans les captures par pêche à la ligne, ce qui peut permettre d'optimiser la gestion des pêcheries.

Remerciements. - Nous tenons à remercier l'ensemble des pisciculteurs des associations de pêche qui ont réalisé avec rigueur les marquages. Cette étude a bénéficié d'une aide financière du Conseil général de Haute-Savoie. Les auteurs souhaitent rendre hommage à R. Rojas-Beltran, décédé en 1997 (voir *Cybium*, 1998, 22: 3-4), qui a initié à la station INRA de Thonon les premières expérimentations de marquage en masse de juvéniles de salmonidés avec l'alizarine red S.

RÉFÉRENCES

ALCOBENDAS M., LECOMTE F., CASTANET J., MEUNIER F.J., MAIRE P. & M. HOLL, 1991. - Technique de marquage en masse des civelles (*Anguilla anguilla*) par balnéation rapide dans un fluorochrome. Application au marquage à la tétracycline de 500 kg de civelles. *Bull. Fr. Pêch. Piscic.*, 321: 43-54.

BECKMAN D.W. & R.G. SCHULZ, 1996. - A simple method for marking fish otoliths with alizarin compounds. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 125: 146-149.

BLOM G., NORDEIDE J.T., SVASAND T. & A. BORGE, 1994. - Application of two fluorescent chemicals, alizarin complexone and alizarin red S, to mark otoliths of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquacult. Fish. Manag.*, Suppl. 1: 229-243.

CAMPANA S.E., 1983. - Calcium deposition and otolith check formation during periods of stress in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 75A: 215-220.

CAUDRON A. & A. CHAMPIGNEULLE, 2002. - Évaluation spatio-temporelle de la contribution du repeuplement en truite (*Salmo trutta* L.) réalisés à des stades précoces dans le bassin amont du Fier (74). *Bull. Fr. Pêch. Piscic.*, 365/366: 455-469.

CHAMPIGNEULLE A. & R. ROJAS BELTRAN, 2001. - Le marquage des poissons. *In*: La Gestion piscicole des Grands Plans d'Eau (Gerdeaux D., ed.), pp. 311-346. Paris: INRA.

CHAMPIGNEULLE A., DEGIORGI F., RAYMOND J.-C. & S. CACHERA, 2002. - Dynamique spatio-temporelle de la contribution du repeuplement en stades précoces de truite (*Salmo trutta* L.) dans la population en place et dans la pêche sur le Doubs franco-suisse. *Bull. Fr. Pêch. Piscic.*, 365/366: 471-485.

CHAMPIGNEULLE A. & S. CACHERA, 2003. - Evaluation of large-scale stocking of early stages of brown trout, *Salmo trutta*, to angler catches in the French-Swiss part of the River Doubs. *Fish. Manag. Ecol.*, 10: 79-85.

DABROWSKI K. & K. TSUKAMOTO, 1986. - Tetracycline tagging in coregonid embryos and larvae. *J. Fish Biol.*, 29: 691-698.

ECKMANN R., CZERKIES P., HELMS C. & K. KLEIBS, 1998. - Evaluating the effectiveness of stocking vendace (*Coregonus albula* L.) eleutheroembryos by alizarin marking of otoliths. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.*, 50: 457-463.

GAULDIE R.W., 1986. - Vaterite otoliths from chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytsha*). *New Zeal. J. Mar. Freshw.*, 20: 209-217.

MEUNIER F., 1994. - Données sur la croissance de l'anguille (*Anguilla anguilla* L.) dans le cours moyen du Rhin, région alsacienne. *Bull. Fr. Pêch. Piscic.*, 335: 133-144.

MEUNIER F.J. & G. BOIVIN, 1978. - Action de la fluorescéine, de l'alizarine, du bleu de calcéine et de diverses doses de tétracycline sur la croissance de la truite et de la carpe. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 18: 1293-1308.

MOHLER J.W., 1997. - Management briefs: Immersion of larval Atlantic salmon in calcein solutions to induce a non-lethally detectable mark. *N. Am. J. Fish. Manag.*, 17: 751-756.

MOHLER J.W., 2003. - Producing fluorescent marks on Atlantic salmon fin rays and scales with calcium via osmotic induction. *N. Am. J. Fish. Manag.*, 23: 1108-1113.

MOHLER J.W., MILLARD M.J. & J.W. FLETCHER, 2002. - Predation by captive wild brook trout on calcein-marked *versus* non-marked Atlantic salmon *fry*. *N. Am. J. Fish. Manag.*, 22: 223-228.

MORALES-NIN B., 2000. - Review on the growth regulation processes of otolith daily increment formation. *Fish. Res.*, 46: 53-67.

MUGIYA Y., 1972. - On aberrant sagittae of Teleostean fish. *Jpn. J. Ichthyol.*, 19: 11-14.

MUGIYA Y. & T. UCHIMARA, 1989. - Otolith resorption induced by anaerobic stress in the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Fish Biol.*, 35: 813-818.

NAGIEC M., DABROWSKI K., NAGIEC C. & E. MURAWSKA, 1988. - Mass-marking of coregonid larvae and fry by tetracycline tagging of otoliths. *Aquat. Fish. Manag.*, 19: 171-178.

NAGIEC M., CZERKIES P., GORYCZKO K., WITKOWSKI A. & E. MURAWSKA, 1995. - Mass-marking of grayling (*Thymallus thymallus* L.) larvae by fluorochrome tagging of otoliths. *Fish. Manag. Ecol.*, 2: 165-175.

NIELSEN L.A., 1992. - Methods for marking fish and shellfish. *Am. Fish. Soc., Spec. Pub.*, 23: 1-208.

PANFILI J., PONTUAL, H., TROADEC H. & P.J. WRIGHT, 2002. - Manuel de Sclérochronologie des Poissons. 464 p. Coédition Ifremer-IRD.

PARKER N.C., GIORGI A.E., HEIDINGER R.C., JESTER D.B., PRINCE E.D. & G.A. WINANS, 1990. - Fish-marking techniques. *Am. Fish. Soc. Symp.*, 7: 879 p.

ROJAS BELTRAN R., CHAMPIGNEULLE A. & G. VINCENT, 1995a. - Mass-marking of bone tissue of *Coregonus lavaretus* and its potential application to monitoring the spatio-temporal distribution of larvae, fry and juveniles of lacustrine fishes. *Hydrobiologia*, 300/301: 399-407.

ROJAS BELTRAN R., GILLET C. & A. CHAMPIGNEULLE, 1995b. - Immersion mass-marking of otoliths and bone tissue of embryos, yolk-sac fry and juveniles of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Nord. J. Freshw. Res.*, 71: 411-418.

RUHLÉ C. & C. GRIEDER, 1989. - Nouvelle méthode de marquage vital d'œufs de salmonidés par incorporation osmotique de tétracycline à la fécondation : expériences préliminaires sur des œufs de truite fario (*Salmo trutta*) et de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull. Fr. Pêch. Piscic.*, 315: 181-188.

STRONG M.B., NEILSON J.D. & J.J. HUNT, 1986. - Aberrant crystallization of Pollck (*Polachius virens*) otoliths. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43: 1457-1463.

TSUKAMOTO K., SEKI Y., OBA T., OYA M. & M. IWAHASHI, 1989a. - Application of otolith to migration study of salmonids. *Physiol. Ecol. Jpn*, Spec. 1: 119-140.

TSUKAMOTO K., KUWADA H., HIROKAWA J., OYA M., SEKIVA S., FUJIMOTO H. & K. IMAIZUMI, 1989b. - Size-dependent mortality of red sea bream (*Pagrus major*) juveniles released with fluorescent otolith-tags in New Bay, Japan. *J. Fish Biol.*, 35: 59-69.

Reçu le 18 février 2005.
Accepté pour publication le 31 août 2005.